

## APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS MOLECULARES NO DIAGNÓSTICO DAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

### APPLICATION OF MOLECULAR TECHNIQUES IN THE DIAGNOSIS OF MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS

Denise Manjurma da Silva Reis<sup>1</sup>, Jeane Eliete Laguila Visentainer<sup>2</sup>, Luciana Conci Macedo<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Biomédica, Mestranda do Programa do pós graduação em Biociências e Fisiopatologia pela Universidade Estadual de Maringá (UEM)

<sup>2</sup>Farmacêutica, Professora do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

<sup>3</sup>Bióloga, Doutora em Biociências e Fisiopatologia pela Universidade Estadual de Maringá (UEM).

\*Endereço para correspondência: Rua Campos Sales, 631 apt 501, Zona 07, CEP: 87020-080, Maringá – PR; E-mail: luconci@gmail.com

#### RESUMO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMP) destacam-se como hiperplasticidade da medula. São doenças clonais de célula tronco pluripotente, com proliferação exacerbada de células maduras no sangue periférico. Nos últimos anos foram descobertas novas mutações, como a presença do cromossomo Ph-Philadelphia, presente em 95% no diagnóstico (Leucemia mieloide crônica), e da presença da mutação JAK2- Janus Quinase 2 (Policitemia vera 90%, trombocitopenia essencial e mielofibrose 50%). Essas anormalidades induzem a ação descontrolada da tirosina quinase que ficam ativadas e direcionadas para vias de transdução de sinal, causando uma hiperproliferação de múltiplas células de linhagem mieloide e alterando a apoptose. Essa nova descoberta, graças ao uso das técnicas moleculares, levou à revisão da classificação das NMP. Desde então, houve novas descobertas de translocações ou mutações genéticas envolvidas na maioria das neoplasias mieloide crônicas (diferentes da LMC) como: mutações da JAK2 (JAK2V617F ou do éxon 12 de JAK2) na PV, TE e MP; além de mutações em MPL (MPLW515K e MPLW515L) na TE. A avaliação de fatores genéticos associados ao desenvolvimento de neoplasias mieloproliferativas crônicas auxilia na identificação de fatores de risco hereditários e possibilita o desenvolvimento de testes diagnósticos voltados para a identificação e caracterização das diferentes causas e risco de transformação neoplásica. O objetivo desse trabalho foi verificar os principais exames laboratoriais e avaliar a aplicação do uso de ferramentas moleculares no diagnóstico precoce e preciso das neoplasias mieloproliferativas.

**Palavras-Chave:** neoplasias mieloproliferativas crônicas; diagnóstico molecular; mutação; JAK2; BCR/ABL.

#### ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), chronic myeloproliferative neoplasms (MPN) stand out as marrow hypercellularity. They are pluripotent stem cell clonal diseases with exacerbated proliferation of mature cells in the peripheral blood. In recent years new mutations have been discovered, such as the presence of the Ph-Philadelphia chromosome present in 95% of the diagnosis (chronic myeloid leukemia), and the presence of the JAK2-Janus Kinase 2 mutation (Polycythemia vera 90%, essential thrombocytopenia and myelofibrosis 50 %). These abnormalities induce the uncontrolled action of tyrosine kinases that are activated and directed to signal transduction pathways, causing a hyperproliferation of multiple cells of myeloid lineage and altering apoptosis. This new discovery, thanks to the use of molecular techniques, led to the revision of the classification of PMN. Since then, there have been new discoveries of translocations or genetic mutations involved in most chronic myelogenous neoplasms (other than CML) such as: mutations of JAK2 (JAK2V617F or exon 12 of JAK2) in PV, TE and MP; In addition to mutations in MPL (MPLW515K and MPLW515L) in ET. The evaluation of genetic factors associated with the development of chronic myeloproliferative neoplasias helps to identify hereditary risk factors and allows the development of diagnostic tests aimed at the identification and characterization of the different causes and risk of neoplastic transformation. The objective of this study was to verify the main laboratory tests and to evaluate the use of molecular tools in the early and accurate diagnosis of myeloproliferative neoplasms.

**Key Words:** chronic myeloproliferative neoplasms; molecular diagnosis mutation; JAK2; BCR/ABL.

## INTRODUÇÃO

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) são doenças clonais de células-tronco hematopoiéticas que induzem a um aumento de proliferação das séries mieloide que leva à leucocitose, aumento da massa eritrocitária ou trombocitose no sangue periférico, e várias podem progredir para fibrose medular ou transformação leucêmica. As principais formas de NMP são Leucemia mieloide crônica (LMC) marcado pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph) positivo, além de policitemia vera (PV), mielofibrose (MF), trombocitemia essencial (TE) marcado pela ausência do cromossomo philadelphia.

Os estudos das NMPs geraram um perfil molecular e introduziram uma mudança significativa no processo de diagnóstico, prognóstico, acompanhamento e tratamento destas doenças. A descoberta da mutação somática do gene *JAK2 V617F* permitiu ampliar o conhecimento sobre as bases moleculares destas doenças, e resultaram no desenvolvimento de estratégias de tratamento importantes (1,4-6).

A utilização do diagnóstico molecular para identificar novas mutações e rearranjos gênicos resultou em estratégias de diagnósticos e tratamentos terapêuticos superiores. Isto levou à utilização de técnicas avançadas de diagnóstico, tais como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional, em Tempo Real (qPCR), PCR digital e sequenciamento de ácidos nucleicos (4-6). Essas alterações genéticas podem ser pesquisadas no sangue periférico, obtido através de punção, tecidos embebidos em parafina ou afresco e fluidos corporais (7-9). A avaliação de fatores genéticos associada ao desenvolvimento de neoplasias mieloproliferativas crônicas ajuda na identificação de fatores de risco hereditários e possibilita o desenvolvimento de testes diagnósticos voltados para a identificação e caracterização das diferentes causas e risco de transformação neoplásica (9,10). Por meio de uma revisão de literatura nas bases de dados *Medline*, *Lilacs*, *Pubmed* e *Google Acadêmico*, foram selecionados artigos com as palavras-chave: neoplasias mieloproliferativas crônicas, leucemia mielocítica crônica, trombocitemia essencial, mielofibrose, *JAK2 V617F*, transcrito

*BCR/ABL*, policitemia vera, diagnóstico molecular, PCR e citogenética.

Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar os principais exames laboratoriais e avaliar a aplicação de testes diagnóstico moleculares no diagnóstico precoce e preciso das neoplasias mieloproliferativas. Os artigos foram revisados e as principais discussões são apresentadas a seguir.

## DIAGNÓSTICO E EXAMES

Para que o diagnóstico seja estabelecido na NMP, o sangue e as células da medula óssea devem ser examinados. A contagem de glóbulos brancos, hemácias e plaquetas aumenta, frequentemente, chegando a níveis muito altos dependendo da NMP. Conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS) 2011, são necessários alguns critérios para a confirmação do diagnóstico. A Tabela 1 apresenta as principais informações de exames e achados laboratoriais de cada fenótipo das principais NMP(1):

## BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA NO DIAGNÓSTICO DAS NMP

Várias técnicas de biologia molecular podem ser utilizadas no diagnóstico diferencial dos pacientes com NMP, tais como: PCR convencional, PCR multiplex, Nested PCR, RT-PCR, PCR em tempo Real (qPCR), PCR digital, porém neste trabalho será relatado os principais métodos utilizados como: cariótipo de banda G, FISH, o PCR convencional, PCR-RFLP, PCR-SSP e PCR em tempo real. A análise molecular diferencia o diagnóstico e tratamento principalmente nas neoplasias mieloproliferativas. Ao contrário da LMC, cujo diagnóstico está relacionado à translocação do 9;22 *BCR/ABL*, por muito tempo era desconhecido o mecanismo molecular das neoplasias PV, TE e MF chamadas então *BCR/ABL* negativas (11). Nas Leucemias o cromossomo Philadelphia (Ph) é a anormalidade citogenética. O cromossomo Ph é originado a partir de uma translocação entre os cromossomos 9 e 22. O cromossomo Ph é encontrado principalmente na leucemia mieloide crônica (LMC), mas também pode ser observado em alguns pacientes com leucemia linfoblástica aguda

(LLA) e em pequeno número de casos leucemia mieloide aguda (LMA). O rearranjo gênico BCR/ABL ou cromossoma Ph é visualizado por técnicas de citogenética,

utilizada no diagnóstico e monitoramento do tratamento quimioterápico em pacientes com LMC (12).

**Tabela 1.** Critérios diagnósticos das neoplasias mieloproliferativas.

NEOPLASIAS	HEMOGRAMA	MIELOGRAMA	CARIOTIPO	CITOGENÉTICA
Leucemia mieloide crônica (LMC)	Presença de anemia de células vermelhas e intensa produção mieloide crônica de células maduras e granulocíticas.	Presença de leucócitos e eosinofilia com aumento de granulócitos e desvio à esquerda. Presença de hiperplasia megacariocítica e basofilia. Na fase aguda, presença blastos, entre 10 e 19% e na crise blástica aumento de 20 % de blastos.	Presença da translocação BCR/ABL9;22 em 90-95% dos casos. Menos de 5% dos casos podem observar variantes que envolvem dois ou mais cromossomos, além do 9 e 22.	Rearranjo BCR/ABL ou ausência do Ph no cariótipo (menos de 5% de casos não detecta Ph e na metade deles o rearranjo está presente). Exames para diagnóstico são PCR SSP/RFLP E REAL TIME para a pesquisa da presença do BCL/ABL.
Policitemia vera (PV)	Leucocitose com desvio até mielócitos. Podendo encontrar presença de basofilia, eosinofilia e monocitose.  Plaquetopenia entre 500.000 e 1000.000/uL (normal 11.000/uL).	>Megacariócitos com variações de tamanhos, sendo predominantes células grandes com núcleos hiperlobulados.	Cromossomos alterados presente em 10 a 30% dos casos (+8+9del 20q), ganho de material (1q, del1q e del13q). Ausência do cromossomo Philadelphia.	PCR SSP/RFLP E REAL TIME - Pesquisa de mutação V617F e JAK2 éxon 12
Mielofibrose primária (MF)	Anemia Hb menor 10g/dl em 60% dos casos, sendo normocrômica e normocítica. Menos de 5% casos hipocrômica microcítica com deficiência de ferro com presença de poiquilocitose, dacriócitos e eritroblastos.  Pode apresentar blastos e pseudo Pelger-Huet.  Trombocitopenia e trombocitose podem ser observadas e presença de Macrotrombócitos.	Presença de proliferação megacariocítica com associação à fibrose medular ou, na ausência de fibrose medular, hiperplasia com aumento da série granulocítica e redução da série eritroide	Alteração 60% dos casos com deleção (13q), deleção (20q) trissomia parcial de 1q, além do +8e+9. Ausência do cromossomo Philadelphia.	PCR SSP, RFLP E REAL TIME - Pesquisa da mutação JAK2 V617F.
Trombocitemia Essencial (TE)	Plaquetas aumentadas, plaquetometria maior que 450.000/uL – sustentada.	Hiperplasia megacariocítica, de 25-48% com megacariócitos maduros aumentado sem número e tamanho.	Pesquisada ausência de BCR/ABL+ paradiiferenciadas neoplasias PV, MF, LMC ou outra neoplasia mieloide. Ausência do cromossomo Philadelphia.	PCR SSP, RFLP E REAL TIME - Pesquisa da mutação JAK2 V617F.

Durante mais de uma década, análises citogenéticas têm sido utilizadas como método de monitoramento do tratamento quimioterápico em pacientes com LMC. Porém, em cerca de 5 a 10% dos pacientes com LMC não é possível evidenciar o cromossomo Ph por esta técnica. Nesses casos, outras metodologias são utilizadas na detecção dessa anormalidade cromossômica, como a

hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e Reação em Cadeia da Polimerase por transcrição reversa (RT-PCR) (13).

As análises citogenéticas requerem aspiração da medula, o que é invasivo ao paciente e, frequentemente, doloroso. Com os métodos da biologia molecular como a RT-PCR é observada uma correlação com resultados citogenéticos superior aos outros métodos, tornando-se um método padrão

altamente sensível de detecção do rearranjo BCR/ABL em pacientes com leucemia mieloide crônica. Também é muito útil na detecção de células leucêmicas residuais, após quimioterapia ou transplante de medula óssea, bem como na confirmação de diagnósticos citogenéticos iniciais falhos (14).

As proteínas de fusão BCR-ABL têm atividade enzimática aumentada, o que favorece a proliferação neoplásica das células hematopoiéticas (5,15). Algumas drogas, recentemente, utilizadas no tratamento da LMC inibem a atividade da tirosinoquinase e têm boa resposta clínica (15,16). Essa patologia levava a óbito em, aproximadamente, 4 anos;mas,após a descoberta da terapia molecular, em 2001, foi desenvolvido o Mesilato de Imatinibe que por sua vez tinha o alvo certo para o tratamento e houve um aumento de sobrevida para 10 anos(17).

Em 2005, um grande número de estudos resultou na descoberta de uma única mutação do JAK2(com pacientes BCR/ABL negativos). JAK2 é uma proteína da família das Janus quinases e é também uma tirosina-quinase que participa do processo de transdução do sinal ativando diferentes vias de sinalização intracelular após ser fosforilada em resposta a diversas citocinas. A proliferação ocorre devido à troca de uma guanina por timina no Exon12 do gene JAK2 levando uma substituição de uma valina por fenilalanina (V617 F) (18).

Trata-se de uma alteração adquirida, somática e só é detectada na linhagem mieloide ou eritroide. A JAK2V617F, além da indução de transcrição mesmo na ausência da EPO, ativa as vias ERK e PI 3-K/Akt, levando à sinalização exagerada e a um aumento na produção de células eritroides

e/ou mieloides com alteração da sua apoptose. Usando a metodologia de PCR-RFLP, seguido de digestão enzimática, SSP ou Real Time, é possível detectar a mutação JAK2 V617F em 96% de pacientes com PV, 28 % com TE e 56 % com MF, onde o diagnóstico precoce pode ajudar no direcionamento de um melhor tratamento e um aumento na sobrevida desses pacientes (18,19).

A aplicação das técnicas de biologia molecular no estudo das NMP tem grande significado, pois permite o conhecimento específico dessas enfermidades. Essas técnicas são úteis ao diagnóstico, prognóstico, tratamento e auxílio nas decisões clínicas durante as manifestações destas doenças, melhorando a qualidade de vida dos pacientes (19,20).

### **Cariótipo de bandas G (detecção de translocações)**

O cariótipo de bandas G é considerado o exame de escolha para identificar o cromossomo Ph. O teste consiste na análise dos cromossomos (medula óssea), interrompidas na metáfase. Em seguida é utilizada a metodologia de bandeamento para banda G, para que seja realizado o pareamento dos cromossomos, tornando mais fácil sua identificação estrutural e numérica, tendo por base sua morfologia, tamanho e presença de bandas equilibradas ou não equilibradas. No cariótipo com bandas G, podem ser detectadas inúmeras translocações que podem diferenciar as NMPs. Na Tabela 2, apresentamos as principais alterações citogenéticas encontradas nas NMPs, as quais auxiliam no diagnóstico e na escolha terapêutica (1,21).

**Tabela 2.** Principais alterações citogenéticas das neoplasias mieloproliferativas<sup>(07,18)</sup>.

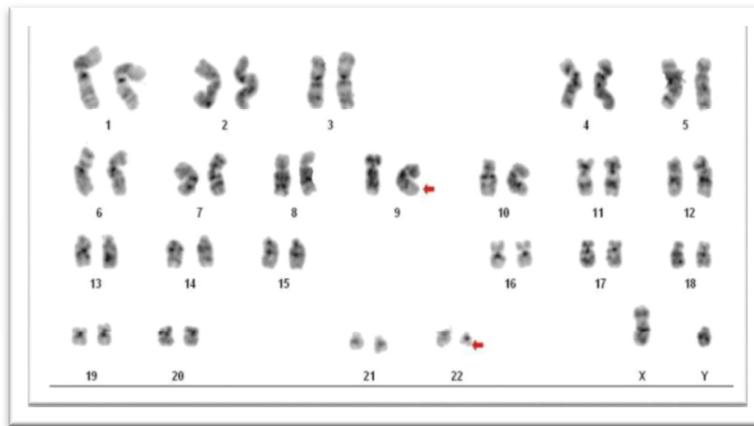
<b>NEOPLASIA</b>	<b>TRANSLOCAÇÃO / DELEÇÃO</b>	<b>% DIAGNÓSTICO POSITIVO (+)</b>
LMC	t9;22 (BCR/ABL) - Ph (q34;q11) p210>p190	(+) EM 90 A 95 % DOS CASOS
PV	DELEÇÃO 9p, 20q +8	(+) EM 10 A 30 % DOS CASOS
MF	DELEÇÃO 13q e 20q; TRISSOMIA PARCIAL de 1q +8+9	(+) EM 60% DOS CASOS
TE	SEM ANORMALIDADES	OUTRO MÉTODO DE DIAGNOSTICO

Em 1960, foi feita a primeira descrição do cromossomo Ph em pacientes

com descrição de leucemia mieloide crônica; mas, somente em 1973 foi reconhecido como

translocação envolvendo os cromossomos 9 (*ABL*) e 22 (*BCR*) (Figura 1), dando origem

ao gene quimérico *BCR-ABL*, o qual aumenta a atividade tirosinaquinase.



**Figura 1.** Cariótipo com presença do cromossomo *Philadelphia 9:22 vide setas translocações*). Fonte: ALBUQUERQUE E.P.A. *Genética Médica como Auxílio Diagnóstico e monitoramento em onco-hematologia*, 2014.

De acordo com a classificação da OMS<sup>(22)</sup> se destacam por suas similaridades o grupo: policitemia vera (PV), mielofibrose (MF) e trombocitemia essencial (TE), passando a ser chamadas de NMP Ph-negativa, causando uma exclusão da leucemia mieloide crônica (LMC) *BCR/ABL* +, devido à presença do Ph(22).

#### Hibridação *in situ* por fluorescência (FISH)

A técnica de FISH pode ser usada para detectar o rearranjo *BCR/ABL*, e tem sido utilizado em situações nas quais não se tem metáfases para análise. Outra vantagem do FISH é que pode ser feito com sangue periférico (1). É um método rápido (aproximadamente, 24 horas) sensível e específico que informa exatamente o que está sendo investigado, analisando inúmeras células, sendo elas presentes ou não no exame de cariótipo. Trata-se de uma reação onde se usa sonda DNA marcada com fluorocromo que vai se ligar ao DNA alvo complementar. Um exemplo é uma reação de FISH com sonda *BCR-ABL*, que se liga ao DNA alvo confirmando a presença do cromossomo Ph, indicado no diagnóstico de LMC sendo positivo e na diferenciação do grupo PV, TE e MF (22,23).

#### PCR convencional

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permite a análise de quantidades infinitas de DNA, a partir da produção de múltiplas cópias da amostra original. Uma das técnicas mais utilizadas nos laboratórios

devido a sua rapidez e baixo custo, a qual possibilita o diagnóstico molecular de várias doenças (24,25). Técnica simples e precisa que exige uma série de passos para obtenção dos resultados pretendidos. O procedimento da PCR provou ser importantíssimo e rico para o diagnóstico de doenças já que, sequências específicas de DNA podem ser amplificadas em grande número e principalmente no diagnóstico das leucemias mieloproliferativas que necessita de acordo com a OMS, a comprovação da mutação *JAK2 V617F*. Indicado no diagnóstico do transcrito *BCR/ABL*, principalmente, nos casos onde o cariótipo não detecta o Ph e fibrose medular e quando não há condições de se realizar o cariótipo (1).

#### PCR SSP E RFLP

Dentre as diversas técnicas da Biologia Molecular, o polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição, ou RFLP (sua sigla em inglês), é uma técnica relativamente simples e de baixo custo que consiste na amplificação pela PCR de uma região do DNA conhecida e posteriormente, as cópias desta região-alvo são digeridas por enzimas de restrição que cortam o DNA em pontos específicos, gerando fragmentos de diferentes tamanhos que são separados por tamanho após eletroforese em gel de agarose (ou poliacrilamida) (24).

A técnica de PCR-SSP (Sequence-Specific primers), faz uso de iniciadores específicos para a sequência de

nucleotídeos do alelo polimórfico. Vários primers são utilizados para cada amostra e os produtos de amplificação específicos serão produzidos se os iniciadores forem complementares ao DNA da amostra (23).

Ambas as técnicas moleculares foram utilizadas no desenvolvimento de ensaios para permitir a detecção da mutação V617F envolvida nas NMP, os quais são utilizados em laboratórios para diagnóstico, fornecendo um dado importante para elaborar estratégias de tratamento e monitoramento específicos dos pacientes com NMP(23).

### Real Time PCR (qPCR)

Recomendado para quantificação do transcrito e para monitoramento de tratamento das NMP (1). A qPCR (PCR quantitativa ou PCR em Tempo Real) é uma técnica recente da biologia molecular que permite a quantificação de DNA e RNA, determinando valores durante a fase exponencial da reação. Essa técnica tem capacidade de gerar resultados com maior sensibilidade, reprodutibilidade, precisão, velocidade na análise, facilidade na quantificação, melhor controle de qualidade no processo e menor risco de contaminação (25).

O qPCR é uma variante do PCR convencional, ou seja, uma reação de amplificação em tempo real que permite que a amplificação e a detecção ocorram simultaneamente num sistema fechado, é um dos mais novos métodos moleculares dos últimos tempos no auxílio diagnóstico e monitoramento de doenças. NaqPCR, a quantidade do produto é analisada ao longo da reação com a introdução de sondas fluorescentes ou fluorocromo, que intercalam na dupla fita de DNA ou por sondas específicas de DNA, ou seja, oligonucleotídeo marcados com substâncias fluorescentes que serão detectados após a hibridização com o DNA complementar, permitindo assim quantificar o produto formado, sendo então possível determinar o número de moléculas de DNA da sequência amplificada que estavam na amostra original (10).

Métodos indiretos ou diretos monitorizam a fluorescência durante o ciclo de PCR. O resultado do método direto é a fluorescência adquirida no resultado da ligação de uma molécula fluorescente ao produto amplificado ou de uma sonda fluorescente interferente ao produto

amplificado. Um exemplo é o fluorocromo *SYBR Green®* que ao se ligar a cadeia dupla de DNA origina fluorescência, sendo aplicável em qualquer produto de PCR, portanto eliminando a necessidade de obter um reagente específico (sonda). Mas, como desvantagem pode perder a especificidade originando um erro na quantificação (10).

Os métodos indiretos possuem sondas (reagentes específicos) para detectar os produtos amplificados. Estas sondas de hibridização específica só emitirão fluorescência quando encontrarem o gene de interesse, sendo esse o mais utilizado. Marcada com fluorocromo fluorescente a reação Taqman® requer essa sonda específica. A primeira sonda chamada de fluorocromo *reporter* na extremidade 5' e a segunda chamada de *quencher* na extremidade 3' (18,19,22).

A fluorescência emitida pelas amostras amplificadas é monitorada em tempo real decorrente de um detector presente no termociclador e durante a fase de extensão no ciclo de PCR, a atividade da DNA Polimerase separa a sonda de hibridização separando o fluorocromo do *quencher*. O software constrói gráficos com os dados obtidos da fluorescência em tempo real na fase de amplificação (19,20).

Este exame é indicado no diagnóstico de pacientes que tenham LMC que apresentam o transcrito BCR-ABL (presença do cromossomo Philadelphia – translocação dos cromossomos 9:22), quantificando os transcritos (mRNA). Esse gene além de ser detectado, pode ter seu nível de expressão medido e avaliado precocemente a resposta ao tratamento da LMC – monitorando a doença residual mínima. Também, não mais importante, é utilizado nas demais doenças mieloproliferativas crônicas, (PV, TE e MF – primária), que apresentam a mutação V617F no gene Janus Kinase2 (JAK2) monitorando a quantidade de transcritos nas células do paciente (10,25).

A identificação da translocação BCR/ABL + e da mutação JAK2 foi um marco molecular para as NMP, bem como para o desenvolvimento de inibidores farmacológicos para este alvo terapêutico. O *Mesilatodelatinibe* é atualmente o mais bem sucedido exemplo da utilização do conhecimento molecular de uma NMP e excelentes resultados com esta droga revolucionou o tratamento da LMC tornando

esta droga o tratamento de escolha para pacientes recém-diagnosticados (16).

No tratamento isolado de inibidores de JAK2 o *Ruxolitinib*, em combinação com drogas que inibem outras proteínas da via de sinalização JAK/STAT, tem sido testado e se mostram promissoras (25).

A descoberta da PCR fez parte desse progresso e com o progresso aqPCR foi desenvolvida visando a quantificação das amostras amplificadas, sendo de grande importância para o acompanhamento das doenças genéticas avaliando a remissão citogenética. A rapidez e a certeza do diagnóstico são fatores importantes e imprescindíveis para o sucesso do tratamento destas NMP, além da alta especificidade, otimizando e qualificando o tratamento.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este estudo foi possível revisar os principais testes moleculares utilizados para o diagnóstico das neoplasias mieloproliferativas. A presença do rearranjo

BCR-ABL foi de suma importância para a sobrevivência dos pacientes com leucemia mieloide crônica, pois confirma uma doença clonal, permitindo então o tratamento correto e a resposta terapêutica (drogas antitirosoquinase). A descoberta da mutação JAK2 V617F contribuiu significativamente para a compreensão dos mecanismos de BCR-ABL (negativa).

Devido à genética complexa de cada ser humano e seu comportamento diferenciado a diversos tipos de neoplasias e doenças, novas técnicas de diagnósticos moleculares foram desenvolvidas. A avaliação de fatores genéticos associada ao desenvolvimento de neoplasias mieloproliferativas crônicas auxilia na identificação de fatores de risco hereditários e possibilita o desenvolvimento de testes diagnósticos, voltados para a identificação e caracterização das diferentes causas e risco de transformação neoplásica, além do desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e desenvolvimento de terapia alvo específica.

## REFERÊNCIAS

- (1) CHAUFFAILLE, M.L.L.F. Neoplasias mieloproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos, **Rev.Bras.Hematol.Hemoter.v.32, n.4, p.308-316, 2010.**
- (2) JALECO, A. et al. **Evolução da biologia molecular nas síndromes mieloproliferativas crônicas e aplicação do seu diagnóstico na atualidade.** Universidade Atlântica, Lisboa/Departamento de Biologia Molecular, Unilabs Diagnósticos S.L.U. Madrid,2010.
- (3) MEIRELLES, C.F.A. **Doenças Mieloproliferativas.** 2014. Tese (Mestrado em Biomedicina) - Instituto de Ciências Biomédicas, Abel Salazar, 2014.
- (4) FADERL, S, KANTARJIAN H.M, Chronic myeloid leukemia and other myeloproliferative neoplasms. **ACP Medicine**, p 1-19, abr,2010.
- (5) KAWAGUCHI, Y. et al. Effect of a selective Abl tyrosine kinase inhibitor, STI571, on in vitro growth of BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia cells. **A Europe Against Cancer Program Leukemia**, n. 15, p. 590-594,jun.2001.
- (6) SADI, V.A. et al. **Aspectos Diagnósticos da Leucemia Mielóide crônica e Detecção de Doença Residual Mínima.2008.**(EstudosCNPq e Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa) - Universidade Católica de Goiás, v. 35, n.11/12, p. 1069-1083,Nov./dez. 2008.
- (7) CORNACCHIONI, A.L. et al. **Leucemia Mielóide Crônica.** 2015.Abrale associação brasileira de linfoma e leucemia, São Paulo,p 6-9, 2015.
- (8) REZENDE, M.C.R. et al. **Levantamento de cariótipos alterados com suspeita clínica de doença mieloproliferativas no setor de citogenética.** Reunião Brasileira de Citogenética – Águas de Lindóia – SP, ago.2011.
- (9) FREITAS, R.M.; MARANDUBA, C.M.C. Mieloproliferative neoplasms and the JAK/STAT signaling pathway: an Overview, **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 37, n.5, p.348–353, set./out.2015.

- (10) MOLINA, A.L.; TOBO P.R. **Uso das Técnicas de Biologia Molecular para Diagnóstico**. 2004. Série Biologia Molecular Atualização, p. 139-142, São Paulo, 2004
- (11) SILVA, A.G.C.C. **Importância da mutação JAK2 V617F nas doenças mieloproliferativas clássicas**. Aveiro, 2010. Tese (Mestrado em biologia) – Departamento de Biologia, Repositório Institucional da Universidade de Aveira, 2010.
- (12) DREXLER, H.G., MacLeod RA, Uphoff CC. Leukemia cell lines: in vitro models for the study of Philadelphia chromosome-positive leukemia. **Leukemia Research**. v.23, n.3, p.207-215, out.1999.
- (13) BENNOUR, A. et al. Molecular cytogenetic characterization of Philadelphia-negative rearrangements in chronic myeloid leukemia patients. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 137, n. 9, p.1329-36, jul. 2011..Sep;137(9):1329-36. doi: 10.1007/s00432-011-1002-4, Epub, jul.2011
- (14) BARBOZA, L. et al. Análise de transcritos da translocação t(9;22) em leucemia mielóide crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, n. 2, p. 89-98, 2000.
- (15) ROHON, P. et al. Identification of e6a2 bcr-abl fusion in a Philadelphia-positive cml with marked basophilia: implications for treatment strategy. **Biomed Pap Med FacUnivPalacky Olomouc Czech Repub**. v. 155, n. 2, p. 187-190, jun.2011.
- (16) FUNKE, V.A.M., et al. Therapy of chronic myeloid leukemia with imatinibmesylate in Brazil: a study of 98 cases. **Revista Brasileira de Hematologiae Hemoterapia**, v. 27, n. 3, p. 159-165, 2005.
- (17) MACIEL, R.M.B. Citogenética lança luz na compreensão das neoplasias hematológicas. **Ver. Saiba Mais**, v. 5, n. 2, jan.2012.
- (18) MONTE-MOR, B.C.R.; COSTA F.F. A mutação JAK2 V617F e as síndromes mieloproliferativas. **Revista Brasileira de Hematologiae Hemoterapia**, .v. 30, n. 3, p. 241-248, 2008.
- (19) GRANDO, C.A.; WAGNER S.C. Avaliação Laboratorial da Doença Residual Mínima na Leucemia Mielóide Crônica por Real-Time PCR. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 6, p. 433-440, dez.2008.
- (20) WAGNER, S.C.; GRANDO, A.C. Avaliação laboratorial da doença residual mínima na leucemia mielóide crônica por Real Time-PCR **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**.v. 44, n.6, p. 433-440, dez.2008.
- (21) LEITE, A.B.; SILVA H.F.; NOGUEIRA, O.L. Trombocitemia Essencial. **Revista Brasileira de Hematologiae Hemoterapia**, .v. 23, n. 1, p. 49-51, 2001.
- (22) GONÇALVES, M.V. et al. Como diagnosticar as neoplasias mieloproliferativas crônicas na era pós-JAK2, **Ver. Fleury MedSaud**.v. 1, n. 3, jan./fev. 2015.
- (23) FRANCHESCHI, D.A.S. et al, Otimização de metodologia PCR-SSP para identificação de polimorfismos genéticos de TNF e IL2. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, .v.31, n.4, p.241-246, 2009.
- (24) ALMEIDA, P.S.R.; SADDI, V.A. Monitoramento de doença residual mínima em leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 4, p. 382-6, dez.2008.
- (25) GABERT, J. Standardization and quality control studies of „real-time“ quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia. **A Europe Against Cancer Program. Leukemia**, v. 1 n. 40, out.2003.
- (26) MORENO, A.C.A. **Diagnóstico Molecular na era da sequencição de 3ª geração e da PCR digital**. Porto, 2013 .Tese (Mestrado) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.
- (27) FENERICH, B.A., **Investigação do efeito do tratamento combinado de inibidores farmacológicos de JAK2 e IRS2 ou mTOR em células JAK2 V617F**. 2015. Tese (doutorado) -

- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), Ribeirão Preto, 2015.
- (28) PAVAN, M.G., and MONTEIRO, FA. **Técnicas moleculares aplicadas à sistemática e ao controle vetorial.** In: GALVÃO, C., org. Vetores da doença de chagas no Brasil [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, p. 241-260.2014.
- (29) FUNKE, V.A.M. et al, Leucemia mieloide crônica e outras doenças mieloproliferativas crônicas, **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 32, n. 1, p. 71-90, abr./mai.2010.

*Enviado: 29/04/2016*  
*Revisado: 14/03/2017*  
*Aceito: 12/04/2017*